

便携式拉曼光谱仪快速检测唾液中盐酸吡格列酮的含量

赵宇¹, 温宝英¹, 黄艺伟¹, 张华¹, 吕佳妮^{2*}, 李剑锋^{1,3*}

1. 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室, 化学化工学院, 福建 厦门 361005
2. 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006
3. 厦门大学深圳研究院, 广东 深圳 518000

摘要 人体唾液与血液中的相应成分有着密切关系。利用唾液代替血液进行检测,可极大地缩短分析时间、减少检测限制、降低安全隐患等,因此在临床医学、毒品管控等方面均有重要意义。发展了便携式拉曼光谱仪利用表面增强拉曼光谱技术快速定量检测唾液中盐酸吡格列酮(口服降血糖药物)含量的方法。借助纳米金溶胶的表面增强拉曼散射效应,在激发光源波长为785 nm时,可以得到低浓度盐酸吡格列酮的高质量拉曼光谱图。同时,不同浓度盐酸吡格列酮表面增强拉曼光谱分析结果表明,该方法还可直接用于唾液中盐酸吡格列酮的定量检测。盐酸吡格列酮含量与其特征峰强度线性相关,相关系数为0.992 3,且最低检测浓度达 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词 表面增强拉曼光谱; 便携式拉曼光谱仪; 盐酸吡格列酮; 唾液

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2018)12-3769-04

引言

唾液是人体重要的体液之一,与其他体液(如血液、尿液、汗液等)一样,含有丰富的组成,且与血液中的相应成分有着密切的关联。与血液样品相比,唾液因其样本采集容易,且可避免因抽血带来的身体不适及感染等优点而被广泛关注。早在1901年—1903年,Michaels和Kirk等就首先报道了可以通过分析唾液的成分以辅助疾病的诊断^[1-2]。近年来,关于唾液与其他体液中药物含量相关性及其对疾病诊断与治疗影响的报道也日趋增多^[3-6]。

盐酸吡格列酮是噻唑烷二酮类口服降血糖药物,适用于2型糖尿病患者。它是高效的、高选择性的过氧化物酶增殖体激活受体,能够调节许多控制葡萄糖及脂质代谢的胰岛素相关的基因转录,属于胰岛素增敏剂^[7]。盐酸吡格列酮通过增强外周组织以及肝脏对胰岛素的敏感性,从而改善胰岛素对葡萄糖和脂肪代谢的控制,使得肝糖的产生和输出减少,最终达到降低血糖和血脂的作用。然而,这类化学药物服用量超过一定范围后,会带来明显的毒副作用,且可能引起患者心肌梗死和心源性死亡。因此,对其用量需进行严格的监控。

目前,盐酸吡格列酮的检测方法主要是高效液相色谱

法。例如,借助高效液相色谱法选择性好、检测灵敏度高等优点,廉江平等、张虹等就通过该方法测定了人血浆中盐酸吡格列酮的浓度^[8-9]。但高效液相色谱法往往需要复杂的前处理过程,分析成本高、时间长,很难实现快速现场监测。同时,该方法不仅需要大型仪器,还需要操作人员具有一定的专业知识,因此无法满足病人日常自我监测的需求。

二十世纪七十年代, Van Duyne等发现吸附在粗糙金银纳米材料表面的待测分子的拉曼信号可被增强 10^6 以上^[10-12]。这一发现逐渐发展成一个新的技术,即表面增强拉曼光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)。SERS能够提供分子水平的指纹信息,以确定待测分子的精细结构。它克服了传统拉曼光谱灵敏度低的缺点,具有极高的灵敏度,能够实现痕量物质的检测,优化条件下甚至能够达到单分子检测水平。同时, SERS还具有无需样品前处理(或前处理简单)、检测速度快、易实现现场检测等优点。因此,自SERS技术发现以来,已发展成为一种强大的分析检测手段,并广泛应用于表面科学、材料科学、生命科学、环境科学、能源科学甚至人们的日常生活中^[13]。

结合便携式拉曼光谱仪,本研究建立了一种利用表面增强拉曼光谱定量检测唾液中盐酸吡格列酮含量的方法。该方法具有灵敏度高、耗时短、操作简便等优点,适用于临床

收稿日期: 2017-11-27, 修订日期: 2018-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(21522508), 深圳市科技计划基础研究(自由探索)项目(JCYJ20170306140934218)资助

作者简介: 赵宇, 1992年生, 厦门大学化学化工学院硕士研究生 e-mail: 605586284@qq.com

* 通讯联系人 e-mail: jianilv@163.com; Li@xmu.edu.cn

药物控制。

1 实验部分

1.1 试剂

盐酸吡格列酮购于国药集团化学试剂有限公司。氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99.99%) 及柠檬酸钠 (99%) 购于阿法埃莎 (中国) 化学有限公司。实验中所用的水均为超纯水 ($> 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, 3 ppb)。

1.2 仪器

超纯水仪 (Heal-force, smart-N 系列), 便携式拉曼光谱仪 (B&W TekOpto-Electronics, 激发光波长 785 nm, 激光功率为 500 mW, 积分时间为 500 ms), 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 金纳米粒子的合成

首先将 200 mL 浓度为 0.01 Wt% 的氯金酸溶液煮沸。然后往里面一次性快速地加入 1.5 mL 柠檬酸钠溶液 (浓度为 1 Wt%), 约 3 min 左右溶液变为红棕色, 之后保持煮沸 30 min, 然后冷却待用。

2 结果与讨论

2.1 Au 纳米溶胶的表征

图 1 分别为用柠檬酸钠法合成制备的金溶胶的扫描电镜

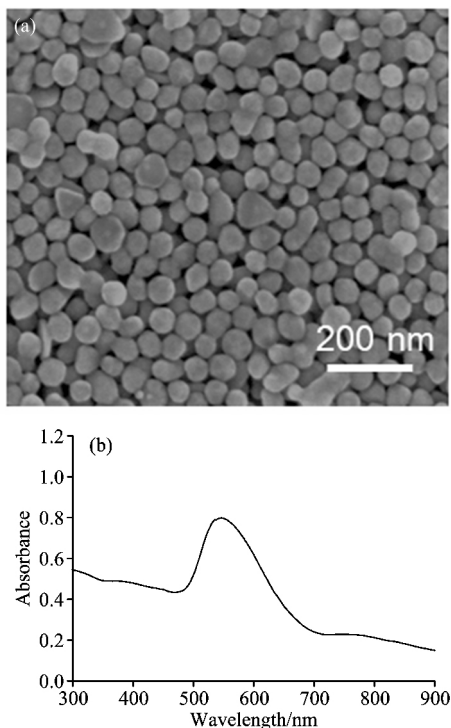


图 1 55 nm 金纳米粒子的扫描电镜图 (a) 和紫外可见吸收光谱图 (b)

Fig. 1 (a) SEM image and (b) UV-Vis spectrum of 55 nm Au NPs

图和紫外-可见吸收光谱图。由图可知, 金纳米粒子呈球形, 且十分均匀, 直径约 55 nm。同时, 在 550 nm 处可观察到一明显的特征吸收峰。这也进一步表明通过该方法可成功实现 Au 纳米溶胶的合成。

2.2 盐酸吡格列酮的表面增强拉曼光谱分析

图 2 为用便携拉曼光谱仪快速检测盐酸吡格列酮的示意图。测试时, 首先将待测样品与 Au 纳米溶胶充分混合, 使得待测分子吸附于 Au 纳米溶胶表面, 然后直接利用便携式拉曼光谱仪测试。测试结果如图 3 所示。由图可知, 对于固体纯样品, 利用普通拉曼光谱, 便可以观测到一系列盐酸吡格列酮的特征拉曼谱峰。然而, 对于 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸吡格列酮标准溶液, 则无法获得相应的拉曼信号。这是因为普通拉曼光谱灵敏度较低, 无法实现痕量样品的检测。

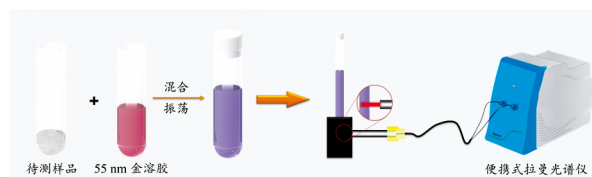


图 2 便携式拉曼光谱仪快速检测盐酸吡格列酮示意图
Fig. 2 The schematic diagram of rapid detection for pioglitazone hydrochloride by a portable Raman spectrometer

为了获得低浓度下盐酸吡格列酮的拉曼信号, 本研究中进一步采用表面增强拉曼光谱对盐酸吡格列酮开展研究。为了排除金溶胶表面杂质对拉曼信号的干扰, 同样取 $100 \mu\text{L}$ 盐酸溶液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 加入 $500 \mu\text{L}$ 纳米金溶胶并进行采谱, 得到金溶胶自身的表面增强拉曼信号 (图 3 黑色曲线)。由图可知, 对于金溶胶本身, 基本观察不到拉曼信号或者说对我们的实验基本没有影响。这是因为, 本研究中采用的柠檬酸

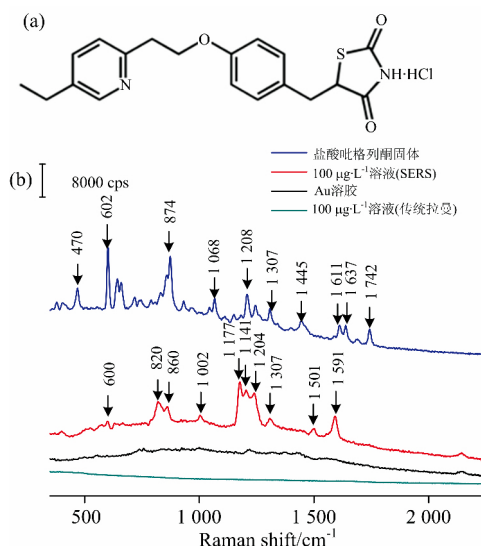


图 3 盐酸吡格列酮的分子结构式 (a) 及其普通拉曼光谱与增强拉曼光谱分析 (b)

Fig. 3 (a) The molecular structure of pioglitazone hydrochloride and (b) its normal Raman spectrum as well as surface-enhanced Raman spectrum

钠为弱保护剂,因此在金溶胶表面的覆盖度很低,故对后续实验的干扰较小。

图 3 中红色曲线为盐酸吡格列酮标准溶液 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的表面增强拉曼光谱图。可以发现,在 $600, 820, 860, 1002, 1177, 1204, 1307, 1501$ 和 1591 cm^{-1} 处可观察到一系列拉曼谱峰。对比盐酸吡格列酮固体粉末及金溶胶的拉曼光谱图可知,这些峰可归属为盐酸吡格列酮的特征谱峰。其中 1177 和 1204 cm^{-1} 可能为对位二取代苯的骨架振动峰, 1501 cm^{-1} 为苯衍生物的环伸缩峰, 1591 cm^{-1} 处的拉曼谱峰可归属于盐酸吡格列酮中苯环碳碳键伸缩振动^[14]。进一步比较还可发现,这些峰相对固体盐酸吡格列酮的普通拉曼峰发生明显位移,且相对强度发生变化。这表明盐酸吡格列酮吸附于 Au 纳米溶胶表面,并与 Au 发生电子作用,从而导致其化学键强度发生改变。其中, 1591 cm^{-1} 处的拉曼特征峰不仅信号较强,且与其他谱峰重叠,因此非常适合用于后续定量检测分析。

2.3 盐酸吡格列酮的定量分析

为了研究表面增强拉曼光谱在盐酸吡格列酮定量分析中的可行性,我们进一步对不同浓度盐酸吡格列酮的标准溶液进行了测试。首先进行盐酸吡格列酮的标准溶液的配制,取 0.1 g 的盐酸吡格列酮于 100 mL 的容量瓶中,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸,定容至标线,得到 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸吡格列酮标准溶液。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液将上述标准溶液稀释,分别

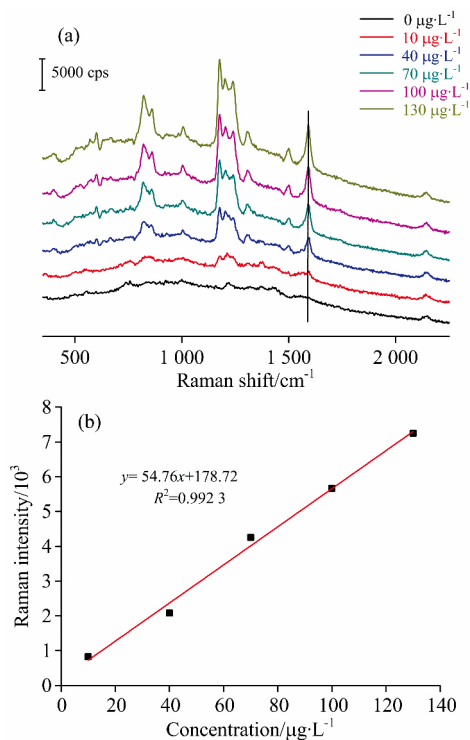


图 4 不同浓度盐酸吡格列酮的表面增强拉曼光谱图 (a) 及其浓度与特征峰 (1591 cm^{-1}) 强度间的关系 (b)

Fig. 4 (a) SERS spectra of pioditazone hydrochloride solution with different concentrations; (b) The relationship between the pioditazone hydrochloride concentration and the Raman intensity of the peak at 1591 cm^{-1}

配制 $130, 100, 70, 40, 10$, 和 $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸吡格列酮标准溶液。取 $100 \mu\text{L}$ 配制好的盐酸吡格列酮标准液,加入 $500 \mu\text{L}$ 的纳米金溶胶,混匀,直接利用便携式拉曼光谱仪采集谱图,便可得到盐酸吡格列酮的表面增强拉曼光谱图,结果如图 4(a) 所示。由图可知,随着盐酸吡格列酮浓度的降低,其拉曼特征峰也在不断减弱。当浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,仍然可明显观察到盐酸吡格列酮的特征拉曼谱峰。这说明表面增强拉曼光谱在盐酸吡格列酮分析中具有很高的灵敏度,最低检测浓度可达 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

同时利用盐酸吡格列酮中苯环碳碳键伸缩振动特征峰 (1591 cm^{-1}) 的强度,我们还对盐酸吡格列酮进行了定量分析。如图 4b 所示,在 $10 \sim 130 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,盐酸吡格列酮浓度与其拉曼强度具有良好的线性关系,相关系数为 0.9923 。这表明该方法不仅灵敏度高,而且适用于盐酸吡格列酮的定量分析。

2.4 唾液中的盐酸吡格列酮含量分析

为了利用上述表面增强拉曼光谱方法检测唾液中盐酸吡格列酮的含量,首先对唾液进行了简单的前处理。取待测唾液样品 1 mL 加入 2 mL 的乙酸乙酯,强烈振荡 2 min ; 在离心机上以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,取 1 mL 的上清液; $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 下利用氮气或空气吹干后,加入 $0.5 \text{ mL } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液强烈振荡 2 min 复溶,得到待测液。往待测液中加入 $500 \mu\text{L}$ 的纳米金溶胶,混匀,利用便携式拉曼光谱仪对待测液进行测试。我们首先对空白唾液进行了分析,如图 5 所示(黑色曲线),未观察到明显的拉曼谱峰。这表明唾液中的其他成分对分析不会带来干扰。然后,我们对含有盐酸吡格列酮的唾液经过同样的前处理后,直接用常规拉曼对其进行检测,如图 5 所示的蓝色曲线,同样未观察到明显的拉曼特征峰,这表明唾液中盐酸吡格列酮的含量很低,用常规拉曼无法进行检测。然后对含有盐酸吡格列酮的唾液,用增强拉曼来进行检测则可明显观察到盐酸吡格列酮的特征拉曼谱峰,且峰型与强度同标准样品基本一致。结合上述标准曲线,还可进一步计算得到该唾液中盐酸吡格列酮的含量为 $96.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述实验结果表明,结合便携式拉曼光谱仪,利用本研究建立的表面增强拉曼光谱方法可对唾液中盐酸吡格列酮的含量进行快速、定量检测。该方法灵敏度高、操作简便,可广泛地应用在临床的药物控制中。

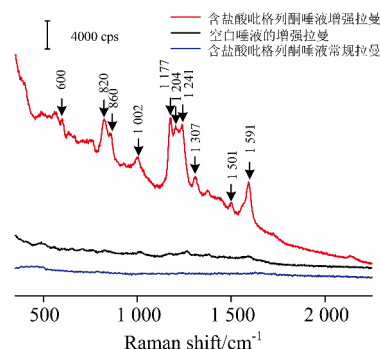


图 5 唾液中盐酸吡格列酮的表面增强拉曼光谱分析

Fig. 5 SERS spectra of pioditazone hydrochloride in human saliva

3 结 论

发展了一种结合便携式拉曼光谱仪,利用表面增强拉曼光谱快速检测唾液中盐酸吡格列酮含量的方法。在该方法中,利用金纳米粒子产生的极强电磁场,可大大增强盐酸吡

格列酮的拉曼信号。因此,该方法具有很高的灵敏度,最低检测浓度可达 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时,该方法还可实现唾液中盐酸吡格列酮含量的定量分析。在 $10 \sim 130 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,盐酸吡格列酮的浓度与其拉曼强度具有良好的线性关系,相关系数为 0.992 3。该方法具有灵敏度高、操作简便、耗时短等优点,非常适合用于临床的用药控制。

References

- [1] Kaufman E, Lamster I B. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2002, 13(2): 197.
- [2] Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, et al. *Clinical Chemistry*, 2011, 57(5): 675.
- [3] CUI Zi-jian, YAO Yu-lu, WANG Yan, et al(崔子健,姚雨露,王艳,等). *The Journal of Light Scattering(光散射学报)*, 2012, 24(1): 40.
- [4] LI Min-hua, TANG Jian(李敏华,唐健). *Chinese Journal of Tissue Engineering Research(中国组织工程研究)*, 2012, 16(11): 2071.
- [5] HU Su-juan, WEN Lei-lei, CUI Yong(胡素娟,闻雷雷,崔勇). *Practical Journal of Clinical Medicine(实用医院临床杂志)*, 2013, 10(1): 39.
- [6] CHEN Yue, ZHU Jun, ZHANG Yun-feng, et al(陈跃,朱军,张云峰,等). *Chinese Journal of Forensic Medicine(中国法医学杂志)*, 2016, 31(1): 9.
- [7] ZOU Da-jin, WANG Qi-jin(邹大进,王奇金). *Chinese Journal of New Drugs(中国新药杂志)*, 2001, 10(6): 469.
- [8] LIAN Jiang-ping, ZHANG Peng, LI Xiao-chuang, et al(廉江平,张鹏,李小川,等). *China Pharmacy(中国药房)*, 2005, 16(9): 687.
- [9] FANG Yu, ZHANG Hong, LI Ying(方昱,张虹,李英). *Chinese Journal of Hospital Pharmacy(中国医院药学杂志)*, 2008, 28(15): 1262.
- [10] Fleischmann M, Hendra P J, McQuillan A J. *Chemical Physics Letters*, 1974, 26: 163.
- [11] Moskovits M. *Reviews of Modern Physics*, 1985, 57: 783.
- [12] Jeanmaire D L, Van Duyne R P. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1977, 84: 1.
- [13] Tian Z Q, Ren B. *Encyclopedia of Electrochemistry*. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.
- [14] WANG Lin, WANG Xue, TIAN Jing-miao, et al(王琳,王雪,田静秒,等). *Science and Technology of Food Industry(食品工业科技)*, 2016, 37(13): 295.

Rapid and Quantitative Detection of Pioglitazone Hydrochloride in Human Saliva by Portable Raman Spectrometer

ZHAO Yu¹, WEN Bao-ying¹, HUANG Yi-wei¹, ZHANG Hua¹, LÜ Jia-ni^{2*}, LI Jian-feng^{1,3*}

1. State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface and Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China
2. Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China
3. Shenzhen Research Institute of Xiamen University, Shenzhen 518000, China

Abstract The components of saliva are closely related to the corresponding components in blood. Using saliva instead of blood for detection can greatly reduce analysis time, limitation and potential safety hazard, thus it is of great importance to clinical research and control of drugs. In this work, combined with a portable Raman spectrometer, quantitative detection of pioglitazone hydrochloride (an oral hypoglycemic drug) in saliva has been realized by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). With this method, the characteristic Raman peaks for pioglitazone hydrochloride can be easily observed. Furthermore, the SERS method can be used to quantitatively detect the pioglitazone hydrochloride in saliva. The concentration of pioglitazone hydrochloride is linearly correlated to its Raman intensity with a coefficient of determination (R^2) of 0.992 3, and the minimum detectable concentration can be as low as $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Keywords Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS); Portable Raman spectrometer; Pioglitazone hydrochloride; Human saliva

* Corresponding authors

(Received Nov. 27, 2017; accepted Mar. 19, 2018)